

Chicken eggshell powder in nutritional intervention of age related bone loss

Citation for published version (APA):

Schaafsma, A. (2000). *Chicken eggshell powder in nutritional intervention of age related bone loss*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universitaire Pers Maastricht.
<https://doi.org/10.26481/dis.20000629as>

Document status and date:

Published: 01/01/2000

DOI:

[10.26481/dis.20000629as](https://doi.org/10.26481/dis.20000629as)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Bone remodeling is a process of bone formation and bone resorption, that takes place on bone surfaces. In this way, the skeleton can respond to changing circumstances (mechanical loading, damage, hormones). Bone remodeling is coupled during middle age, i.e. formation takes place following resorption. During the period of bone growth, however, bone formation exceeds bone resorption (bone modeling). During menopause and the next few years, bone resorption and bone turnover increase, because of a strongly decreased production of oestrogens. A considerable amount of bone may be lost. Therefore, establishment of a high peak bone mass during puberty and adolescence (maximum modeling), preservation of bone mass during middle age (balanced remodeling), and inhibition of bone loss at older age (reduced bone turnover and controlled serum PTH) are all of importance in osteoporosis prevention. In Western countries, the prevalence of osteoporosis among postmenopausal women (55-70 years of age) is estimated to be 15-25%. Only women with increased risk, e.g. family history of fractures, will be investigated and treated to decrease fracture risk. Many women, however, will not be aware of their precarious skeletal condition. For this reason, strategies to prevent osteoporosis should be directed towards all postmenopausal women. These strategies also have to start soon after menopause since preservation of bone architecture is important for bone strength. Adapted nutrition and physical activity may inhibit or even prevent age-related bone loss, as measured by bone mineral density (BMD) of the lumbar spine and hip. A number of minerals and vitamins are of special interest, as reviewed in detail in Chapter 2. Calcium and vitamin D have

shown beneficial effects on BMD and fracture rate, especially at older age and when normal dietary intakes are low. Magnesium may be involved in bone preservation, increased bone strength, and possibly bone formation. Fluorine and probably also strontium stimulate bone formation. Vitamin K is necessary for the post-translational carboxylation of glutamic acid residues of the protein osteocalcin. Carboxylated osteocalcin binds strongly to bone mineral and is probably involved in proper bone mineralization. Vitamin C is necessary for the synthesis of hydroxyproline and hydroxylysine (both components of collagen), and stimulates osteoblasts to produce osteocalcin, alkaline phosphatase, and type I collagen matrix.. Positive effects of these minerals and vitamins may already be expected in amounts about two times higher as currently recommended or consumed. For calcium supplementation, sources of natural origin, such as chicken eggshell powder (ES), are of interest because they contain more components than calcium only. This thesis deals with the composition of ES, the apparent digestibility of its calcium, and the effects of an ES enriched supplement on BMD of the lumbar spine and hip of postmenopausal women. Analyses of ES (Chapter 3) revealed that especially calcium and strontium are present in relevant amounts, 401 ± 7 mg/g and 371 ± 161 µg/g respectively, compared with recommended or consumed amounts. Other elements in ES, or hormones related to bone metabolism, are not expected to be of importance because of the small amounts detected. Of particular interest was the finding of only low levels of potentially toxic lead, mercury, aluminum and cadmium. Since ES is primarily a calcium source,



apparent digestibility of calcium from ES was studied in piglets (Chapter 4). ES was given in combination with casein from cow's milk or soya protein isolate. Purified calcium carbonate, known for its highly bioavailable calcium, was used as reference calcium source. Casein supplies caseinophosphopeptides which may stimulate calcium absorption. From soya protein an inhibitory activity on calcium absorption is reported. However, because of the presence of isoflavones, calcium retention in bone may be stimulated. The piglet studies show that calcium availability from ES is as good as from purified calcium carbonate when combined with casein, and better when combined with soya protein isolate.

With this information, ES enriched dairy-based supplements were studied in human. A former and uncontrolled study in osteoporotic patients showed an increased BMD of the lumbar spine and hip after 4 months of daily supplementation with 6 g of ES. These patients also reported a strong reduction in pain. With regard to the upper tolerable daily intake of 2,500 mg of calcium, however, our supplements contained 'only' 3 g of ES. Furthermore the supplements were enriched with other minerals and vitamins including magnesium, vitamin D₃ and vitamin K₁. A pilot study (Chapter 5), in subjects (n = 10) with osteoporosis or osteopenia, showed positive effects of the ES supplement on BMD. After 4-8 months, BMDs of the lumbar spine (anteroposterior), total proximal femur, and trochanter were increased with 4.1%, 1.9%, and 1.8%, respectively. Also an important reduction in pain was reported although the questionnaire was not validated. Compared with 10 apparently healthy postmenopausal women, the intervention group showed significant improvements in BMD of the lumbar spine, femoral neck, and total proximal femur. Voluntarily, 6 women used the product for another 16 months, without

any check on intake of the supplement, and at only half the dosage. After this period, BMD of the measured sites was still increased but not significantly different from baseline. This study indicates that the ES enriched supplement may improve BMD of subjects with a low baseline BMD in the short term and may prevent bone demineralization for a longer period. Next, we studied the effects of an ES enriched supplement on BMD of apparently healthy postmenopausal women with normal (Chapter 6) and low BMD (Chapter 7) of the lumbar spine, during a period of 12 months. Apart from BMD we also studied changes in parameters of collagen metabolism and bone turnover [amino-terminal propeptide extension of type I collagen (P1NP), bone specific alkaline phosphatase (b-ALP), intact-parathyroid hormone (intact-PTH), deoxypyridinoline (D-Pyr), and urinary calcium excretion (u-Ca/Cr)], of vitamin-D status [25(OH)D], and of vitamin K-status (carboxylated osteocalcin). The mean estimated habitual, daily calcium intakes were 1,295 (normal BMD) and 1,190 mg (low BMD) which are higher than currently recommended in the Netherlands (900 mg) but lower than the suggested optimal amount (1,500 mg) for postmenopausal women.

In women with normal BMD of the lumbar spine, the ES group (n = 24) tended to increase BMD at all measured sites, except for the trochanter. The increase was significant for the femoral neck (1.8%) and Ward's triangle (3.4%). Women (n = 22) taking a supplement containing calcium carbonate instead of ES did not show significant improvements in BMD. In the placebo group (n = 27), BMD of the lumbar spine and trochanter increased slightly but not to a significant extent, whereas the other measured sites tended to decrease. In women with low BMD of the lumbar spine, the ES group (n = 22) tended to increase BMD at all measured sites which

was significant for the trochanter (1.6%) and Ward's triangle (3.7%). The reference group ($n = 23$), taking 1,000 mg calcium and 400 IU vitamin D_3 per day did not show a significant change in BMD at any site, but they tended to increase BMD of the lumbar spine, total proximal femur and Ward's triangle. In both studies there were no significant differences between the ES and reference groups. Only the increase in BMD of femoral neck in ES supplemented women with normal BMD was significantly different from the slight decrease in BMD of women in the placebo group.

Of the biochemical parameters studied, P1NP, D-Pyr, PTH, 25(OH)D and %carbOC strongly responded to intervention. In all calcium and vitamin D_3 supplemented groups, levels of P1NP and PTH decreased within the study period of 12 months. Urinary excretion of D-Pyr was significantly decreased in the ES group with normal BMD, in the ES group with low BMD, and in the reference group with low BMD, after 12, 6, and 12 months respectively. No change in D-Pyr concentrations was found in the placebo group and calcium carbonate group of women with normal BMD. Decreases in P1NP, D-Pyr and PTH indicate a decreased bone turnover. Effects of vitamin D_3 supplementation were reflected in increased serum levels of 25(OH)D. However, a decline in 25(OH)D concentrations during the winter months was not prevented in women with low BMD. Vitamin K_1 supplementation probably increased %carbOC levels. A stimulatory effect of supplemented calcium and/or vitamin D_3 on carboxylation of osteocalcin, however, cannot be excluded. The u-Ca/Cr ratio increased significantly only in women with low BMD taking the reference product. This suggests a higher absorption or a

lower retention of calcium from the reference product.

The above shows that ES contains a high percentage of well absorbable calcium, relevant amounts of strontium, and low levels of heavy metals. In human studies it was found to be a good alternative for the traditional purified calcium carbonate and for the combination of calcium carbonate and calcium lacto-gluconate. The ES enriched supplements increased BMD of the hip, and possibly also of the spine, in healthy postmenopausal women with a baseline calcium intake of about 1,200 mg. Women taking reference products did not show significant changes in BMD, which implies that ES might have an additional benefit compared with the other calcium sources. The underlying mechanism for effects on BMD might be a decreased bone turnover as indicated by decreases in serum P1NP, serum PTH, and urinary D-Pyr in women supplemented with calcium and vitamin D_3 . The current USA recommendations for the vitamins D and K do not seem to be adequate for Dutch postmenopausal women. Additional intakes of >400 IU per day might be necessary since daily supplementation with 400 IU vitamin D_3 could not prevent a decline in serum 25(OH)D during the winter months in women with a low BMD. Based on the carboxylation of osteocalcin, a daily consumption of 330 μ g vitamin K_1 may be proposed for postmenopausal women. Taken together, this thesis shows that nutritional intervention, with calcium, magnesium, vitamin D_3 and vitamin K_1 , can be successful in the prevention of age related bone loss. The use of ES, as source of calcium and possibly other components, has probably contributed much to this success.

Samenvatting

Botombouw (bot remodellering) is een samenspel van botafbraak en botaanmaak aan het oppervlak van het bot. Door dit proces kan het skelet reageren op veranderende omstandigheden (mechanische belasting, beschadigingen, hormonen). Op middelbare leeftijd is de botombouw normaliter in evenwicht en volgt botaanmaak op botafbraak. Tijdens de groei van het skelet is dit proces niet gekoppeld en overheerst botaanmaak (bot modellering). Bij ouderen en in het bijzonder bij vrouwen na de menopauze, overheerst de botafbraak. Door een sterk verminderde oestrogeenproductie wordt tijdens de menopauze en de eerste jaren daarna de botafbraak gestimuleerd, neemt de botombouwsnelheid toe en kan een aanzienlijk verlies van bot optreden. Bij ouderen kan botafbraak worden gestimuleerd door een stijgende serum spiegel van het parathyroid hormoon (PTH). In de strijd tegen osteoporose zijn dan ook de volgende punten van belang: een maximale botdichtheid tijdens puberteit en adolescentie (maximale modellering), behoud van botmassa op middelbare leeftijd (gebalanceerde bot remodellering) en het remmen van botafbraak op oudere leeftijd (verlaagde botombouwsnelheid en het beheersen van de PTH spiegel). In de Westerse wereld komt osteoporose voor bij 15-25% van de postmenopauzale vrouwen (55-70 jaar). Alleen vrouwen met een vermeend hoger risico, b.v. osteoporotische fracturen in de familie, worden onderzocht en eventueel behandeld om het risico op een fractuur te verminderen. Veel vrouwen zijn dan ook niet op de hoogte van hun hachelijke bot-status. Om wille van deze vrouwen, zullen maatregelen ter voorkoming van osteoporose zich moeten richten op alle

postmenopauzale vrouwen. Verder zullen deze maatregelen spoedig na de menopauze moeten worden doorgevoerd voor het behoud van bot-architectuur hetgeen belangrijk is voor de botsterkte. Gemeten aan de botmineraaldichtheid (BMD) van de lumbale wervelkolom en heup, kunnen aangepaste voeding en lichaamsbeweging leeftijdsgerelateerd botverlies verminderen of zelfs voorkomen. Daarbij zijn een aantal mineralen en vitamines van bijzonder belang (hoofdstuk 2). Calcium en vitamine D verbeteren de BMD en verlagen het risico op fracturen. Dit is met name het geval bij oudere mensen en bij een lage inneming van beide voedingsstoffen uit de normale voeding. Magnesium is mogelijk betrokken bij het behoud van bot en botaanmaak, en is daarmee van belang voor de botsterkte. Fluor en mogelijk ook strontium stimuleren botaanmaak. Vitamine K is essentieel voor de carboxylering van glutaminezuurresiduen van het eiwit osteocalcine. Gecarboxyleerd osteocalcine bindt sterk aan het botmineraal en is waarschijnlijk betrokken bij een juiste mineralisatie van bot. Vitamine C is nodig voor de synthese van hydroxyproline en hydroxylysine (beide een onderdeel van collageen) en stimuleert osteoblasten tot de produktie van osteocalcine, alkalisch fosfatase en matrix type I collageen. De positieve effecten van deze mineralen en vitamines kunnen al optreden bij hoeveelheden die ongeveer twee keer hoger zijn dan de huidige aanbeveling of consumptie. Natuurlijke calciumbronnen, zoals kippeneierschalenmeel (ES) zijn interessant omdat ze meer dan alleen calcium verstrekken. Dit proefschrift behandelt de samenstelling van ES, de ogenschijnlijke verteerbaarheid van ES-calcium, en de effecten van een met ES



verrijkt supplement op de BMD van lumbale wervelkolom en heup van postmenopauzale vrouwen.

Uit onderzoek naar de samenstelling van ES (hoofdstuk 3) blijkt dat met name calcium (401 ± 7 mg/g) en strontium (371 ± 161 µg/g) in relevante hoeveelheden aanwezig zijn. Andere voor bot belangrijke mineralen en hormonen komen slechts in uiterst kleine en wellicht onbelangrijke hoeveelheden voor. Dit geldt ook voor het potentieel toxische lood, kwik, aluminium en cadmium, hetgeen van groot belang is. Omdat ES primair als calciumbron zou worden toegepast, is de ogenschijnlijke verteerbaarheid van ES calcium bestudeerd in biggen (hoofdstuk 4). ES werd gegeven in combinatie met koemelk caseïne of soja-eiwit isolaat. Gezuiverd calciumcarbonaat, bekend vanwege de hoge beschikbaarheid van het calcium, diende als referentie calciumbron. Caseïnofosfopeptiden, welke vrijkomen bij de vertering van caseïne, stimuleren mogelijk de calcium absorptie. Hoewel soja-eiwit de calcium absorptie kan remmen, kunnen de aanwezige isoflavonen de calcium retentie in het bot stimuleren. De biggenproeven geven aan dat de beschikbaarheid van calcium uit ES gelijk is aan die van calciumcarbonaat indien caseïne als eiwitbron wordt gebruikt. In combinatie met soja-eiwit isolaat is de calcium beschikbaarheid uit ES echter beter.

Op grond van deze informatie zijn ES verrijkte en op zuivel gebaseerde supplementen bestudeerd in humaan onderzoek. In eerder uitgevoerd, niet gecontroleerd, onderzoek met osteoporotische patiënten verbeterde de BMD van de lumbale wervelkolom en heup. Tevens verminderde de pijn aanzienlijk bij deze patiënten. Zij consumeerden dagelijkse 6 gram ES gedurende 4 maanden. Om echter de dagelijks aanvaardbare inneming van 2500 mg calcium niet te overschrijden, verstrekten

de supplementen in onze onderzoeken 'slechts' 3 gram ES per dag. Verder waren de supplementen verrijkt met andere mineralen en vitaminen waaronder magnesium, vitamine D₃ en vitamine K₂. In een vooronderzoek (hoofdstuk 5) met 10 personen met osteoporose of osteopenie had het ES supplement een positief effect op de BMD. Gedurende 4-8 maanden stegen de BMD's van de lumbale wervelkolom (in buik-rug positie gemeten), totale proximale femur en trochanter met respectievelijk 4,1%, 1,9% en 1,8%. Tevens werd, middels een niet-gevalideerde pijnscore lijst, een belangrijke vermindering van pijn waargenomen. In vergelijking met 10 ogenschijnlijk gezonde postmenopauzale vrouwen, trad in de interventie-group een duidelijke verbetering op in de BMD van de lumbale wervelkolom, de femurhals en de totale proximale femur. Uit eigen beweging zijn 6 vrouwen het supplement blijven gebruiken gedurende nog eens 16 maanden, zij het in een halve dosering en zonder controle op het gebruik. Na deze periode waren de BMD's weliswaar nog hoger maar niet significant verschillend van de waarden bij aanvang van het onderzoek. Dit vooronderzoek duidt dan ook op een mogelijke verbetering van BMD in personen met een lage botmassa op korte termijn en op een mogelijk voorkomen van botontkalking op langere termijn bij gebruik van het ES supplement. Vervolgens is een ES verrijkt supplement gedurende 1 jaar verstrekt aan ogenschijnlijk gezonde postmenopauzale vrouwen met een normale (hoofdstuk 6) en lage BMD (hoofdstuk 7) van de lumbale wervelkolom. Naast BMD is ook gekeken naar veranderingen in parameters van collageenmetabolisme en botombouw [aminoterminal propeptide-extentie van type I collageen (PINP), bot specifiek alkalisch fosfatase (b-ALP), intact parathyroid hormoon (intact-PTH), deoxypyridinoline (D-Pyr), en calcium uitscheiding in de urine (u-Ca/Cr)],

vitamine D-status [25(OH)D] en vitamine K-status (gecarboxyleerd osteocalcine). De geschatte, gemiddelde calcium inneming uit de normale voeding was 1295 en 1190 mg/dag in de groep vrouwen met een respectievelijk normale en lage BMD. Deze innemingen zijn hoger dan de huidige Nederlandse aanbeveling (900 mg) maar lager dan de veronderstelde optimale hoeveelheid calcium voor postmenopauzale vrouwen (1500 mg).

In de ES-groep ($n = 24$) met een normale BMD van de wervelkolom, nam de BMD van de femurhals en Ward's triangle significant toe met respectievelijk 1,8% en 3,4%. De andere BMD's stegen niet significant met uitzondering van de trochanter. In de groep vrouwen met het gezuiverde calcium-carbonaat ($n = 22$), in plaats van ES, werd eveneens een lichte stijging waargenomen in BMD's maar deze waren niet significant. In de placebo groep ($n = 27$) nam de BMD van de lumbale wervelkolom en trochanter in geringe mate (niet significant) toe terwijl de andere meetpunten een niet significante daling lieten zien.

In vrouwen met een lage BMD van de wervelkolom, nam in de ES-groep ($n = 22$) de BMD van de trochanter (1,6%) en Ward's triangle (3,7%) significant toe. De BMD's van de wervelkolom, femurhals, intertrochanter en de totale proximale femur lieten wel een verbetering zien, maar deze was niet significant. In de referentie groep ($n = 23$), met 1000 mg calcium en 400 IE vitamine D₃ per dag, trad geen significante verbetering op van de BMD's maar was wel een neiging naar verbeterde BMD's van lumbale wervel-kolom, totale proximale femur en Ward's triangle.

In beide onderzoeken bestonden geen significante verschillen tussen de ES en referentie groepen. Wel was de toename in BMD van de femurhals in ES gesuppleerde vrouwen met een normale BMD significant verschillend van de lichte daling in de placebo groep.

Van de biochemische parameters reageerden P1NP, D-Pyr, 25(OH)D en %carbOC sterk op de interventie. In alle calcium en vitamine D gesuppleerde groepen daalden P1NP en PTH binnen de duur van het onderzoek (12 maanden). De uitscheiding van D-Pyr in de urine was significant gedaald in de ES groep met een normale en lage BMD, en in de referentie-groep met een lage BMD, na respectievelijk 12, 6 en 12 maanden. In de placebo en calcium-carbonaat-groep met een normale BMD veranderde de uitscheiding van D-Pyr niet. Verlaagde gehalten van P1NP, D-Pyr en PTH duiden op een verlaging van de botombouwsnelheid. Vitamine D₃ suppletie werd weerspiegeld in hogere plasma 25(OH)D concentraties. Echter, in de vrouwen met een lage BMD kon een daling van 25(OH)D gedurende de wintermaanden niet worden voorkomen. Vitamine K₁ suppletie resulteerde in hogere %carbOC spiegels. Hierbij kan een stimulerend effect van calcium en vitamine D₃ niet worden uitgesloten. De u- Ca/Cr ratio was alleen significant verhoogd in de referentie groep met een lage BMD. Dit is mogelijk een gevolg van een verhoogde calcium absorptie of een verlaagde calcium retentie.

Uit het bovenstaande blijkt dat ES een hoog gehalte aan goed beschikbaar calcium bevat, een relevante hoeveelheid strontium en een laag gehalte aan zware metalen. Bij mensen is gebleken dat ES niet alleen een goed alternatief is voor het veel gebruikte gezuiverde calcium-carbonaat, maar ook voor de combinatie van calciumcarbonaat en calciumlactogluconaat. In gezonde postmenopauzale vrouwen, met een calcium inneming uit de normale voeding van ongeveer 1200 mg per dag, steeg de BMD van de heup en mogelijk ook van de lumbale wervels na gebruik van het ES verrijkte supplement. Omdat significante veranderingen in BMD niet werden gezien met de referentie-producten, kan dit betekenen dat ES een



meerwaarde heeft ten opzichte van de andere calciumbronnen. Een verlaagde botopbouwingsnelheid in vrouwen gesuppleerd met calcium en vitamine D₃, ligt mogelijk ten grondslag aan behoud of verbetering van de BMD. De huidige Amerikaanse aanbevelingen voor vitamine D en K lijken niet toereikend voor Nederlandse postmenopauzale vrouwen. Om een daling van serum 25(OH)D gedurende de wintermaanden te voorkomen is een dagelijkse inneming van meer dan 400 IE vitamine D wenselijk. Op basis van de carboxylering van

osteocalcine zou voor vitamine K₁ een postmenopauzale aanbeveling kunnen gelden van 330 µg per dag. Alles bij elkaar geeft dit proefschrift aan dat voedingsinterventie met calcium, magnesium, vitamine D₃ en vitamine K₁, succesvol kan zijn in het voorkomen van leeftijds-gerelateerd botverlies. Het gebruik van kippeneierschalenmeel, als bron van calcium en mogelijk andere componenten, heeft waarschijnlijk in belangrijke mate aan dit succes bijgedragen.